

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno - biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija

Tena Dominko

6912/BT

OTPORNOST PREMA ŽUČNIM SOLIMA I
ANTIMIKROBNA AKTIVNOST BAKTERIJA MLIJEČNE
KISELINE

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Biotehnologija 4

Mentor: Doc.dr.sc.*Andreja Leboš Pavunc*

Zagreb, 2017.

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Andreje Leboš Pavunc, u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost „Probiotici i starter kulture - površinski proteini i bakteriocini“ (IP-2014-09-7009).

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo

Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

Otpornost prema žučnim solima i antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline

Tena Dominko, 0058204760

Sažetak: Cilj ovog završnog rada bio je ispitati prisutnost fragmenata *bsh* gena, koji kodira za hidrolazu žučnih soli, kod bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1, *L. brevis* SF9B, *L. brevis* SF15B i *L. plantarum* D13. Naime, bakterije aktivnošću enzima hidrolaze žučnih soli mogu utjecati na regulaciju koncentracije kolesterola, a ujedno taj enzim može biti odgovoran za preživljavanje probiotičkih sojeva u gastrointestinalnom traktu gdje između ostalog, postoje nepovoljni uvjeti zbog žučnih soli. PCR reakcijom su fragmenti *bsh* gena potvrđeni kod sojeva *Lactobacillus plantarum* D13, *L. brevis* D6 i *L. brevis* SF9B. Probiotičke bakterije također imaju važnu ulogu u inhibiciji rasta potencijalno patogenih mikroorganizama, a to antimikrobno djelovanje je posljedica biosinteze raznih ekstracelularnih metabolita, među kojima su i bakteriocini. Stoga je u ovom radu dodatno ispitivana antimikrobna aktivnost soja *Lactobacillus plantarum* D13, metodom s dvostrukim slojem agara. Bakteriocinska aktivnost ispitivanog soja je inducirana kokultivacijom s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048. Dodatkom žučnih soli, kao dodatnih stresnih okolišnih čimbenika za bakterije mliječne kiseline, dodatno je potaknuto bakteriocinsko djelovanje prema test-mikroorganizmu *St. aureus* 3048.

Ključne riječi: antimikrobna aktivnost, bakteriocini, hidrolaza žučnih soli, kokultivacija, *Lactobacillus plantarum*

Rad sadrži: 32 stranice, 12 slika, 6 tablica, 40 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno – biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: doc. dr. sc. Andreja Leboš Pavunc

Pomoć pri izradi: Martina Banić, mag. ing. biotechn.
Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Datum obrane: 7. 7. 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Antibiotic, Enzyme, Probiotic and Starter Cultures Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Bile Salt Resistance and Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria

Tena Dominko, 0058204760

Abstract: The aim of this study was to examine presence of *bsh* gene, encoding for bile salt hydrolase (BSH), in lactic acid bacteria strains *Lactobacillus helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1, *L. brevis* SF9B, *L. brevis* SF15B and *L. plantarum* D13. Probiotic bacteria can be involved in regulation of cholesterol level by BSH activity. At the same time, BSH activity could be responsible for survival of probiotic strains in stressful gastrointestinal tract conditions, caused, among other, by bile salts. According to results of PCR reactions, *bsh* gene fragments were detected in *Lactobacillus plantarum* D13, *L. brevis* D6 and *L. brevis* SF9B strains. In addition, lactic acid bacteria have an important role in inhibition of growth of potentially pathogenic microorganisms. That antimicrobial activity is result of biosynthesis of various extracellular compounds, including bacteriocins. Hence, antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* D13 strain was also examined by agar-spot-agar method. Bacteriocin activity was induced by cocultivation with test-microorganisms *L. monocytogenes* ATCC 19111 and *St. aureus* 3048. Addition of bile salts, as additional stressful environmental condition, has further induced bacteriocin activity towards test-microorganism *St. aureus* 3048.

Keywords: antimicrobial activity, bacteriocins, bile salt hydrolase, cocultivation, *Lactobacillus plantarum*

Thesis contains: 32 pages, 12 figures, 6 tables, 40 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Andreja Leboš Pavunc, Assistant Professor

Technical support and assistance: Martina Banić, mag. ing. biotechn.
Katarina Zorić, mag. ing. biotechn.

Defence date: 7.7.2017.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Bakterije mliječne kiseline	2
2.2. Upotreba bakterija mliječne kiseline kao probiotičkih dodataka prehrani...	3
2.3. Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline	3
2.3.1. Mliječna kiselina	3
2.3.2. Diacetil	3
2.3.3. Vodikov peroksid	4
2.3.4. Reuterin	4
2.3.5. Bakteriocini	4
2.4. Metabolizam žučnih kiselina	5
2.5. Aktivnost hidrolaza žučnih soli	6
2.5.1. Potencijalni efektori u ljudskom organizmu	7
2.6. Probiotici i dekonjugacija žučnih kiselina	8
3. MATERIJALI I METODE RADA	10
3.1. MATERIJALI	10
3.1.1. Radni mikroorganizmi	10
3.1.2. Hranjive podloge	11
3.1.3. Kemikalije	12
3.1.4. Aparatura i pribor	12
3.2. METODE RADA	13
3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama	13
3.2.2. Izolacija DNA	13
3.2.3. PCR	14
3.2.4. Kokultivacija soja <i>Lactobacillus plantarum</i> D13, nakon uzgoja sa i bez žučnih soli, uz test-mikroorganizme <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111 i <i>Staphylococcus aureus</i> 3048.	16
3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara ("Agar-spot-test metoda")	16
4. REZULTATI I RASPRAVA	10
4.1. Ispitivanje prisutnosti <i>bsh</i> gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli	18
4.2. Kokultivacija <i>L. plantarum</i> D13 s test-mikroorganizmima <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111i <i>Staphylococcus aureus</i> 3048.	20
5. ZAKLJUČCI	18
6. LITERATURA	28

1. UVOD

Bakterije mliječne kiseline čine specifičnu skupinu srodnih bakterija koje rastu u mikroaerofilnim ili samo u anaerobnim uvjetima te proizvode mliječnu kiselinu kao krajnji proizvod metabolizma. To su Gram-pozitivne, nesporgene, mezofilne bakterije, kemoorganotrofi, katalaza-negativne, nemaju citokroma, ne sintetiziraju porfirine, a rastu samo na kompleksnim hranjivim podlogama (Šušković i sur., 2010). Imaju GRAS (Generally Regarded As Safe) status i najčešće su korištene bakterije kao starter kulture za industrijsku preradu fermentiranih mliječnih proizvoda, mesa, povrća i proizvoda od žitarica. U konceptu funkcionalne hrane, posebno u mliječnoj industriji, postoji sve veći interes za probiotičke proizvode koji sadrže bakterije mliječne kiseline. Izraz probiotik označava jednu ili više kultura živih mikroorganizama koji, primijenjeni u ljudi ili životinja, djeluju korisno na domaćina, poboljšavajući svojstva autohtone mikroflore probavnog sustava domaćina (Šušković, 1996).

Pri izboru sojeva u svrhu njihove primjene kao probiotika, postoji niz kriterija koje moraju zadovoljiti. Mogućnost hidroliziranja žučnih soli jedan je od važnih kriterija pri izboru probiotičkih sojeva. Naime, u ljudskom duodenumu prisutne su žučne soli, pa je neophodno da probiotički sojevi bakterija mliječne kiseline imaju sposobnost rasta u prisustvu određenih koncentracija žučnih soli te da ih mogu hidrolizirati.

Jedan od najvažnijih svojstava probiotika je zaštita protiv patogena u intestinalnom traktu domaćina. Antimikrobno djelovanje starter kultura i probiotičkih bakterija se pripisuje proizvodnji metabolita, kao što su organske kiseline (mliječna i octena kiselina), vodikov peroksid, etanol, diacetil, acetaldehid, drugi niskomolekularni spojevi s antimikrobnom aktivnošću i bakteriocini (Brkić, 1995).

Cilj ovog završnog rada bio je ispitati imaju li probiotički sojevi *Lactobacillus helveticus* M92, *Lactobacillus brevis* D6, *Lactobacillus brevis* ZG1, *Lactobacillus brevis* SF9B, *Lactobacillus brevis* SF15B i *Lactobacillus plantarum* D13, koji su izolirani, identificirani i okarakterizirani kao probiotički, u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura, *bsh* gen koji kodira za hidrolazu žučnih soli. Osim toga, ispitano je i induciranje bakteriocinske aktivnosti soja *Lactobacillus plantarum* D13 kokultivacijom s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048 te utjecaj žučnih soli kao dodatnih stresnih okolišnih čimbenika na bakteriocinsku aktivnost.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) čine grupu bakterija koje previranjem različitih izvora ugljika proizvode mliječnu kiselinu (Šušković i sur., 1998). To su Gram-pozitivne, nesporogene, katalaza-negativne bakterije prirodno prisutne na supstratima bogatim hranjivim tvarima kao što su mlijeko, meso, razgradni biljni materijali i u humanom gastrointestinalnom traktu. Stanice se dijele u jednoj ravni, osim *pediokoka*. Imaju potrebu za kompleksnim faktorima rasta kao što su vitamini i aminokiseline. DNA bakterije mliječne kiseline sadržava manje od 55% udjela G+C parova baza.

Podijeljene su u jedan red te šest porodica i pripadaju koljenu Firmicutes. U bakterije mliječne kiseline pripadaju rodovi *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Lactococcus*, *Weissella*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Melissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Vagococcus*. Kao starter kulture u proizvodnji fermentiranih mliječnih, mesnih i povrtnih proizvoda koriste se *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Carnobacterium* (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010). Prema načinu fermentacije ugljikohidrata dijele se na homofermentativne i heterofermentativne bakterije, a s obzirom na morfologiju na bacile i koke. Glavni proizvod njihovog metabolizma je mliječna kiselina, ali one proizvode još i octenu kiselinu, vodikov peroksid, diacetil, acetaldehid, masne kiseline i neke druge antimikrobne komponente kao što su bakteriocini (male proteinske molekule s antimikrobnim djelovanjem prvenstveno prema srodnim vrstama). Ti produkti metabolizma se razlikuju za određene vrste pa i sojeve.

Bakterije mliječne kiseline su prvo izolirane iz mlijeka (Carr i sur., 2002) te se od tada mogu naći u fermentiranim proizvodima kao što su meso, mliječni proizvodi, povrće, pekarski proizvodi te fermentirana pića (Liu, 2003). Također, bakterije mliječne kiseline čine dio zdrave humane crijevne mikroflore (Hammes i sur., 1995). Neke BMK koriste se kao probiotici koji pozitivno djeluju na crijevni ekosustav ljudi i životinja. Takve vrste BMK moraju imati određena funkcionalna svojstva, a jedno od najvažnijih je da proizvode antimikrobne tvari kao što su organske kiseline (mliječna i octena kiselina), vodikov peroksid i bakteriocine kako bi potisnuli razvoj patogenih mikroorganizama. Osim antimikrobnog djelovanja, funkcionalna svojstva probiotika, između ostalog, uključuju adheziju na crijevni epitel te poticanje imunološkog odgovora.

2.2. Upotreba bakterija mliječne kiseline kao probiotičkih dodataka prehrani

Dodaci prehrani s probioticima su pokazali potencijalni utjecaj na povećanje ili smanjenje tjelesne mase kod ljudi i/ili životinja (Angelakis i sur., 2013). Probiotici koji povećavaju tjelesnu masu koriste se kao promotori rasta na farmama te još služe za suzbijanje pothranjenosti ili sarkopenije (stanje progresivnog gubitka mišićne mase i snage koje je usko povezano sa starenjem organizma) u ljudi. Probiotici koji smanjuju tjelesnu masu mogu se primjenjivati za reguliranje tjelesne mase kod pretilih ljudi (u kombinaciji s promjenom prehrane) (Joyce i sur., 2014).

2.3. Antimikrobna aktivnost bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline proizvode različite antimikrobne spojeve: vodikov peroksid, ugljikov dioksid, diacetil, bakteriocine i druge spojeve niske molekulske mase (Mobolaji i Wuraola, 2011; Ammor i sur., 2006).

2.3.1. Mliječna kiselina

Primarni antimikrobni metabolit bakterija mliječne kiseline je mliječna kiselina. Proizvedena mliječna kiselina može biti u L- ili D- izomernom obliku. L-mliječna kiselina se koristi u prehrambenoj i farmaceutskoj industriji te u proizvodnji biopolimera, a D-mliječna kiselina je toksična za ljude. Uz to, L-mliječna kiselina ima veći inhibicijski učinak od D-mliječne kiseline (Papagianni, 2012). Antimikrobno djelovanje mliječne kiseline iskazuje se interferiranjem u održavanje potencijala stanične membrane, pritom inhibirajući aktivni transport čime se smanjuje intracelularni pH i inhibiraju različite metaboličke funkcije. Mliječna kiselina inhibira Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, kvasce, plijesni i neke gljive (Rattanachaikunsopon i Phumkhachorn, 2010).

2.3.2. Diacetil

Neki sojevi *Lactococcus lactis* i neke vrste rodova *Leuconostoc* i *Weissella* proizvode diacetil. Diacetil se uglavnom dobiva iz citrata u kometaboličkoj fermentaciji s laktozom (Kleerebezem i sur., 2000). Gram-negativne bakterije su puno osjetljivije od Gram-pozitivnih na djelovanje diacetila, pri čemu diacetil inhibira rast Gram-negativnih bakterija reakcijom s arginin-vezujućim proteinom i pritom izaziva trošenje arginina (Ammor i sur., 2006).

2.3.3. Vodikov peroksid

Bakterije mliječne kiseline proizvode vodikov peroksid u prisutnosti kisika. Antimikrobno djelovanje vodikovog peroksida se očituje kroz oksidaciju sulfhidrilne skupine što rezultira denaturacijom brojnih enzima. Vodikov peroksid također uzrokuje peroksidaciju membranskih lipida te je prekursor u proizvodnji superoksidnog ($O_2^{\cdot-}$) i hidroksilnog (OH^{\cdot}) radikala koji uzrokuju oštećenja DNA (Sunil i Narayana, 2008; Ammor i sur., 2006). Tako sintetizirani vodikov peroksid može inhibirati rast psihotropnih i patogenih mikroorganizama (Zalan i sur., 2005).

2.3.4. Reuterin

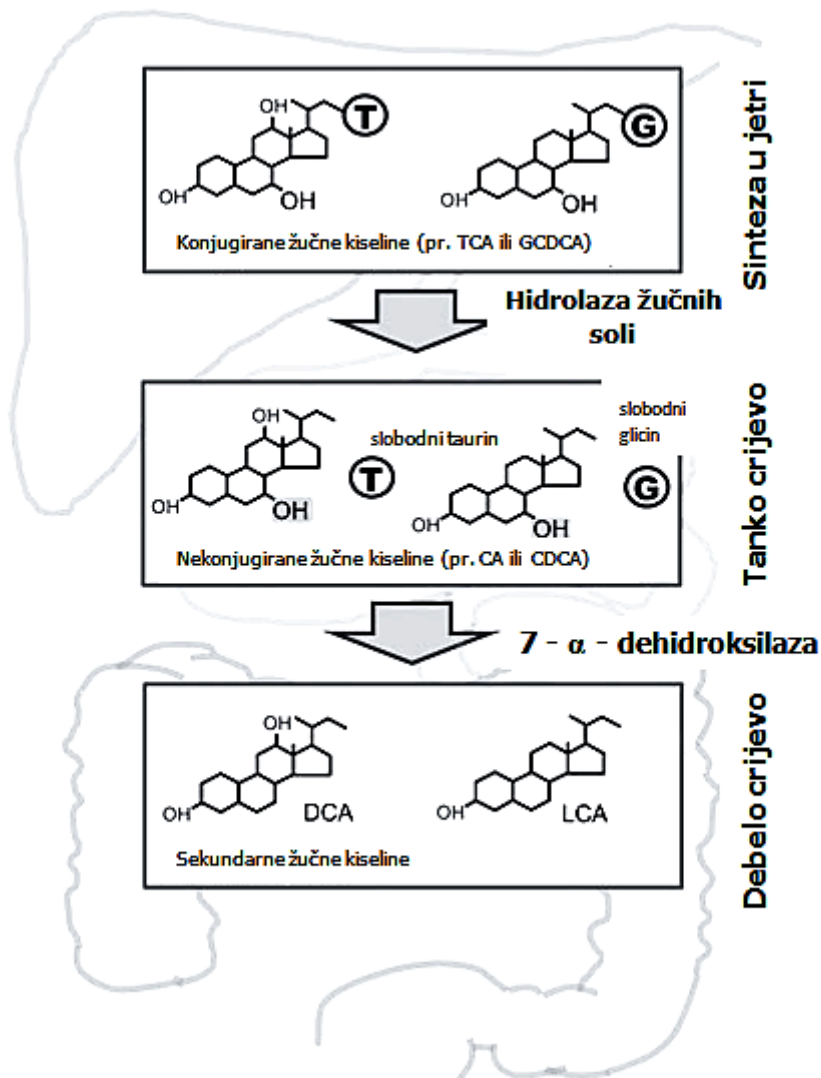
Reuterin proizvode brojni laktobacili u anaerobnim uvjetima. Proizvodnji pogoduje prisutnost glicerola. Reuterin inhibira rast mikroorganizama iz rodova *Aspergillus* i *Fusarium* te može imati ulogu u prevenciji stvaranja mikotoksina u fermentiranoj hrani. Također, djeluje na Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije, enteropatogene, kvasce, gljive, protozoe i viruse (Nes i sur., 2012). Organizmi kvarenja osjetljivi na reuterin pripadaju vrstama iz rodova *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* i *Trypanosoma*.

2.3.5. Bakteriocini

Bakteriocini su ribosomski sintetizirani peptidi ili proteini s antimikrobnom aktivnošću, a proizvode ih mnoge Gram–pozitivne i Gram–negativne bakterije, no one koje proizvode bakterije mliječne kiseline iz hrane privlače veliku pažnju zbog mogućnosti njihove potencijalne primjene u prehrambenoj industriji kao prirodnih konzervansa (biokonzervansi). Bakteriocini bakterija mliječne kiseline su mali antimikrobni peptidi ili proteini koji posjeduju aktivnost prema srodnim Gram–pozitivnim bakterijama, dok su stanice bakterije koja ih proizvodi imune na vlastite bakteriocine. Postoji nekoliko klasifikacija bakteriocina podijeljenih u 3 ili 4 grupe: (1) lantibiotici ili mali, termostabilni bakteriocini koji sadrže lantionin i imaju jedan ili dva peptida (grupa I), čiji su biološki inaktivirani prepeptidi podvrgnuti post–translacijskim modifikacijama; (2) mali, termostabilni nelantibiotički bakteriocini (grupa II), koji ne podliježu post–translacijskim modifikacijama, a uključuju one slične pediocinima ili bakteriocinima koji su aktivni prema listerii (grupa IIa), bakteriocini s dva peptida (grupa IIb) i cirkularne bakteriocine (grupa IIc); i (3) bakteriolizini ili veliki, termolabilni, litički proteini, često murein hidrolaze (grupa III) (De Vuyst i Leroy, 2007; Cotter i sur., 2005). Neki autori također predlažu (4) grupu IV bakteriocina kojima su

potrebni neproteinazni ostaci (lipidi, ugljikohidrati) za aktivnost (Šušković i sur., 2010; De Vuyst i Leroy, 2007; Cotter i sur., 2005).

2.4. Metabolizam žučnih kiselina



Slika 1. Mikrobni metabolizam žučnih kiselina (Joyce i sur., 2014) (CA - kolna kiselina; CDCA - kenodeoksikolna kiselina; TCA - taurokolna kiselina; GCDCA - glikokenodeoksikolna kiselina; DCA - deoksikolna kiselina; LCA - litokolna kiselina)

Primarne žučne kiseline, na primjer kolna i kenodeoksikolna kiselina, sintetiziraju se *de novo* u jetri iz kolesterola. Topivost njihove hidrofozne steroidne jezgre povećava se konjugacijom N – acil ostataka s glicinom (G) (glikokenodeoksikolna kiselina) ili taurinom (T) (taurokolna kiselina). Pohranjuju se u žučnom mjehuru i naknadno se otpuštaju u duodenum. U tankom crijevu mikrobna aktivnost hidrolaze žučnih soli (HŽS) vrši

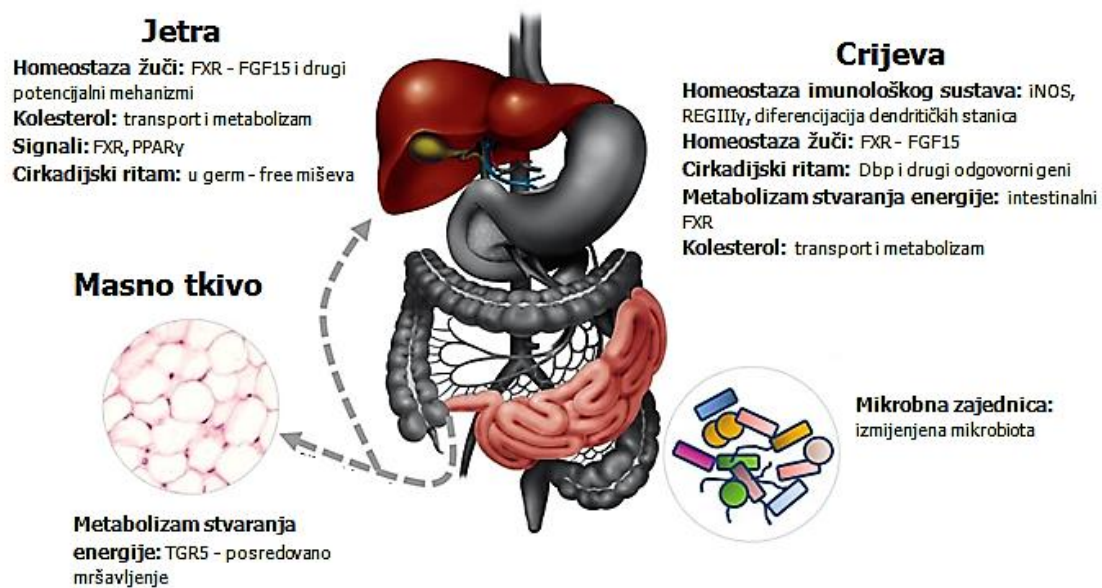
dekonjugaciju, odnosno hidrolizira amidnu vezu, oslobađa taurin i glicin te tako stvara nekonjugirane žučne kiseline. Žučne kiseline se uspješno reabsorbiraju kroz tanko crijevo u sustav enterohepatičke portalne cirkulacije. Nešto žučnih kiselina ulazi u debelo crijevo gdje se dalje metaboliziraju mikrobnom γ -dehidroksilazom i stvaraju sekundarne žučne kiseline (Joyce i sur., 2014; Begley i sur., 2006).

2.5. Aktivnost hidrolaza žučnih soli

Aktivnost hidrolaza žučnih soli pronađena je kod vrsta iz rodova *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* i *Bacteroides*. Osim dva soja *Bacteroides*, sve ostale bakterije s hidrolazom žučnih soli su Gram-pozitivne. Ostale Gram-negativne intestinalne bakterije ne pokazuju aktivnost hidrolaze žučnih soli, niti su pronađeni *bsh* homologni geni u genomu (Begley i sur., 2006).

Eksperimentalni dokazi sugeriraju kako aktivnost hidrolaza žučnih soli može pridonijeti rezistenciji mikroorganizama prema žučnim solima i pomoći kolonizaciju gastrointestinalne okoline. Utvrđeno je kako ekspresija klonirane hidrolaze žučnih soli kod mikroorganizma *Listeria innocua* značajno povećava *in vitro* toleranciju na žuč i crijevnu kolonizaciju u miševima u odnosu na kontrolni soj bez hidrolaze žučnih soli. Također, postoje hipoteze kako hidrolaza žučnih soli može utjecati na zdravlje domaćina (de Aguiar i sur., 2013).

Žučne kiseline pokazuju specifičnu interakciju s receptorom domaćina uključujući FXR i G-vezan proteinski receptor TGR5 (Watanabe i sur., 2006). Analizom metabolita žučnih kiselina kod miševa otkrivena je njihova široka distribucija u različita tkiva, uključujući srce, jetru, bubrege i plazmu, što ukazuje da se žučne kiseline potencijalno mogu ponašati kao posrednici u prenošenju signala u mnoge tkivne odjeljke domaćina (Swann i sur., 2011). U istraživanju dekonjugiranih žučnih kiselina, pokazalo se povećano smanjenje tjelesne težine kod miševa koji su konzumirali hranu bogatu mastima, kroz mehanizam koji je uključivao TGR5 signal za povećanje brzine metabolizma u masnom tkivu (Watanabe i sur., 2006).



Slika 2. Utjecaj nekonjugiranih žučnih kiselina na lokalne i sistemske fiziološke procese u domaćinu (Joyce i sur., 2014)

Uz ulogu u emulgiranju prehrambenih masti u crijevima, žučne kiseline utječu na homeostazu imunološkog sustava, metabolizam stvaranja energije, homeostazu žuči i potencijalno na periferni cirkadijski ritam. Nekonjugirane žučne kiseline također imaju i važan utjecaj na sastav crijevne mikrobiote (Joyce i sur., 2014).

2.5.1. Potencijalni efektori u ljudskom organizmu

Eksperimentalno je utvrđena uloga probiotika s hidrolazama žučnih soli u snižavanju kolesterola, a to je efluks sistem kodiran s *Abcg5/8* (Jones i sur., 2013). Također je utvrđeno da je ekspresija gena *Abcg5/8* specifično povišena u gastrointestinalnom traktu pomoću ekspresije hidrolaza žučnih soli i u „germ-free“ životinjama i onima konvencijalno uzgojenima.

Utvrđeno je i kako aktivnost hidrolaza žučnih soli u gastrointestinalnom traktu „germ-free“ miševa djeluje kao promotor ekspresije brojnih sistema koji igraju važnu ulogu u crijevnoj homeostazi. Obnovljeni protein (*REGIII γ*) je antibakterijski protein proizveden od strane domaćina koji modulira lokalnu imunološku homeostazu u crijevima koje usmjeravaju Gram-

pozitivne bakterije (Vaishnava i sur., 2011). Utvrđeno je da je gastrointestinalna ekspresija *REGIIIγ* povećana kroz rekonvencijalizaciju „germ-free“ miševa i kroz BSH1 aktivnost u obje vrste uzgoja miševa. To sugerira da dekonjugacija žučnih kiselina može biti važan signal u regulaciji homeostatske „feedback“ petlje. Sve to se slaže s konceptom u kojem lokalne žučne kiseline mogu povratno regulirati mikrobiotu, ili direktno ili kroz regulaciju homeostatskih faktora koji mogu utjecati na mikrobiotu (Islam i sur., 2011). Pokazano je da visoka gastrointestinalna aktivnost hidrolaza žučnih soli može smanjiti tjelesnu težinu kod konvencionalno uzgojenih miševa (Joyce i sur., 2014).

2.6. Probiotici i dekonjugacija žučnih kiselina

Povećanje koncentracije dekonjugiranih žučnih kiselina u plazmi zdravih dobrovoljaca koji su primali soj *L. reuteri* NCIMB 30242, koji sadrži hidrolazu žučnih soli, ukazuje na potencijal probiotika u izmjeni metabolizma žučnih kiselina u ljudi (Jones i sur., 2012). Miševi i ljudi razlikuju se u osnovnoj liniji profila žučnih kiselina. Mišje uglavnom sadrže taurokonjugirane žučne kiseline dok ljudske sadrže veće koncentracije gliko-konjugirane žučne kiseline (Lin, 2014; Smith i sur., 2014; Begley i sur., 2005).

Brojna istraživanja utvrdila su smanjenje tjelesne težine zbog korištenja probiotika u miševa i ljudi. U mnogo slučajeva probiotici predstavljaju *Lactobacillus* vrste za koje je najvjerojatnije da imaju aktivnost dekonjugiranih žučnih soli. Neke *Lactobacillus* vrste potpomažu povećanju tjelesne težine u ljudi i životinja i time sugeriraju kako postoje brojni potencijalni mehanizmi preko kojih probiotici mogu mijenjati tjelesnu težinu i da taj efekt može ovisiti o vrsti ili čak soju bakterija korištenih u probiotiku (Angelakis i sur., 2013). Postoji ograničen broj podataka o mehanizmima povezanim s određenim probioticima koji povećavaju i onima koji smanjuju tjelesnu težinu. Vjerojatno je kako aktivnost hidrolaze žučnih soli igra važnu ulogu u procesu izmjene tjelesne težine. Drugi probiotički faktori koji mogu imati utjecaj na proces povećanja težine mogu obuhvaćati i opći utjecaj na sastav zajednice mikrobioma te direktan ili indirektan utjecaj na produkciju drugih važnih metabolita, uključujući i kratkolančane masne kiseline (Joyce i sur., 2014).

Ipak, postoje i potencijalni nepovoljni efekti na domaćina. Na primjer, povećane razine nekonjugiranih žučnih kiselina mogu potencijalno dovesti do malapsorpcije lipida i rezultirati steatorejom (Choi i sur., 2015). Još važnije, sekundarne žučne kiseline deoksikolna kiselina (DCA) i litokolna kiselina (LCA), producirane su iz nekonjugiranih žučnih kiselina pomoću specifičnih mikrobnih konverzija u debelom crijevu. Te sekundarne žučne kiseline

povezuju se s visokim rizikom obolijevanja od raka debelog crijeva (Ajouz i sur., 2014). Za FXR receptor žučnih kiselina koji je preferencijalno stimuliran nekonjugiranim žučnim kiselinama smatra se da štiti od raka debelog crijeva, sugerirajući da se dekonjugacijom žučnih kiselina može povećati antitumorni efekt FXR (Maran i sur., 2009).

3. MATERIJALI I METODE RADA

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Radni mikroorganizmi

U ovom radu su korišteni sojevi bakterija mliječne kiseline, prikazani u tablici 1 te test-mikroorganizmi, prikazani u tablici 2. Sojevi su dio Zbirke mikroorganizama Laboratorija za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura Zavoda za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (ZBMK).

Tablica 1. Sojevi bakterija mliječne kiseline korišteni u ovom radu uz optimalne uvjete uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Lactobacillus helveticus</i>	M92	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	D6	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	ZG1	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF9B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus brevis</i>	SF15B	MRS, 37°C, anaerobno
<i>Lactobacillus plantarum</i>	D13	MRS, 37°C, anaerobno

Tablica 2. Test-mikroorganizmi korišteni u ovom radu uz optimalne uvjete uzgoja

Bakterijski sojevi	Oznaka soja	Hranjive podloge i uvjeti rasta
<i>Staphylococcus aureus</i>	3048	BHI, 37°C, aerobno
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19111	BHI, 37°C, aerobno

3.1.2. Hranjive podloge

U radu su korištene sljedeće podloge:

a) hranjive podloge za održavanje i uzgoj bakterije mliječne kiseline

- MRS (De Man, Rogosa i Sharpe) agar, sastava (g/l destilirane vode): pepton 10; mesni ekstrakt 10; kvašćev ekstrakt 5; glukoza 20; Tween 80 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05; natrijev-acetat 5; agar 20. pH vrijednost podloge iznosi 6,5, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 min.
- MRS bujon je istog sastava kao podloga MRS agar, ali bez dodatka agara.

b) hranjive podloge za održavanje i uzgoj test – mikroorganizama

- BHI (Brain heart infusion) agar sastava (g/l destilirane vode): infuzije telećeg mozga i goveđeg srca i peptoni 27,7; glukoza 2; NaCl 5; puferi 2,5; agar 13. pH podloge je 7,4, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta.
- BHI bujon je istog sastava kao podloga BHI agar, ali bez dodatka agara.

c) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test–mikroorganizma *Staphylococcus aureus*

- BP (baird-Parker) agar sastava (g/l destilirane vode): pepton od kazeina 10; goveđi ekstrakt 5; kvašćev ekstrakt 1; natrijev piruvat 10; litijev klorid 5; glicin 12; agar 17. pH podloge je 6,8, a sterilizacija se provodi pri 121°C tijekom 15 minuta. Nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 5% emulzije telurita i žumanjka.

d) selektivna hranjiva podloga za izolaciju test–mikroorganizma *Listeria monocytogenes*

- ChromoBio® Listeria agar sastava (g/l destilirane vode): peptoni 34; glukoza 2; mineralne soli 15,5; natrijev piruvat 2; L- α -fosfatidilinositol 2; kromogeni supstrat 0,05; antibiotici 0,17; amfotericin B 0,01; puferi 3,5; agar 13. pH podloge je 6,8. 35 g podloge se resuspendira u 400 ml destilirane vode i zagrije, uz često miješanje, do vrenja. Nakon toga se provodi sterilizacija pri 121°C tijekom 15 minuta, a nakon što se podloga ohladi na 50°C, sterilno se doda 100 ml tekućeg dodatka i jedna bočica selektivnog dodatka.

3.1.3. Kemikalije

- natrijev dodecilsulfat, „Sigma“, SAD
- glicerol, „Alkaloid“, Makedonija
- Tris (hidroksimetil)-aminometan, „Carlo Erba“, Italija
- natrijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- etanol, „Kemika“, Hrvatska
- ledena octena kiselina, „Kemika“, Hrvatska
- glukoza, „Kemika“, Hrvatska
- lizozim, „EuroBio“, Francuska
- RNase A, „Qiagen“, Španjolska
- fenol-kloroform, „Sigma“, SAD
- natrijev acetat, „Kemika“, Hrvatska
- izopropranol, „Kemika“, Hrvatska
- magnezijev klorid, „Kemika“, Hrvatska
- proteinaza K, „Fermentas“, Kanada
- kompleksal III (etilendiamintetraoctena kiselina dinatrijeva sol-dihidrat), „Kemika“, Hrvatska
- etidijev bromid, „Boehringer Mannheim GmbH“, Mannheim
- agaroza, „Appligane“, Francuska
- λ DNA HindIII standard, „Fermentas“, Kanada
- 100 bp DNA Ladder standard, „Invitrogen“, SAD
- PCR pufer 10x, „Fermentas“, Kanada
- magnezijev klorid, 25 mM, „Fermentas“, Kanada
- dNTP mix, 10 mM, „Fermentas“, Kanada
- Taq polimeraza, 1 U, „Fermentas“, Kanada
- Nuclease Free Water, „Takara“, Japan
- početnice „Metabion“, Njemačka
- žučne soli, „Torlak“, Srbija

3.1.4. Aparatura i pribor

- Petrijeve zdjelice
- epruvete
- Erlenmayer tikvice
- automatske pipete, „Eppendorf“, SAD

- ependorfice
- kivete za centrifugiranje; 15 ml, 50 ml
- stalci za ependorfice
- stalci za epruvete
- pinceta
- autoklav, „Sutjeska“, Jugoslavija
- termostat, „Instrumentarija“, Hrvatska
- vodena kupelj, „Sutjeska“, Jugoslavija
- vibro-mješač EV-100, „Kartell“, Italija
- vaga, „Tehtnica“, Slovenija
- magnetska mješalica, „Tehtnica“, Slovenija
- hladnjak, „Gorenje“, Slovenija
- centrifuga Centric, „Tehtnica“, Slovenija
- centrifuga s hlađenjem 5804R, „Eppendorf“, SAD
- tresilica, „New Brunswick Scientific“, SAD
- zamrzivač (-80°C), „New Brunswick Scientific“, SAD
- elektroforetske kadice, „Cleaver, Scientific Ltd“, Velika Britanija
- DNA-termoblok, „Eppendorf“, SAD
- transiluminator MiniBIS Pro, DNT, Izrael
- BioSpec Nano, „Shimatzu“, Japan

3.2. METODE RADA

3.2.1. Održavanje i čuvanja mikroorganizama

Sojevi bakterija mliječne kiseline su čuvani pri -80°C u MRS tekućoj hranjivoj podlozi uz dodatak 15 % (v/v) glicerola, a test-mikroorganizmi su čuvani na -80°C u BHI bujonu s 15% (v/v) glicerola. Dan prije eksperimenta sojevi se inokuliraju u svježu hranjivu podlogu te inkubiraju pri optimalnim temperaturama rasta prema uvjetima navedenim u tablicama 1 i 2.

3.2.2. Izolacija DNA

Volumen od 1,5 ml prekonoćnih kultura bakterija mliječne kiseline (navedene u tablici 1) se centrifugira i ispire u GTE puferu (25 mM TRIS + 10 mM EDTA + 50 mM glukoze). Stanice se resuspendiraju u 500 µl GTE pufera, uz dodatak lizozima (8 mg/500 µl) i RNA-ze

(50 µl/ml), i inkubiraju 30 minuta pri 37°C. Zatim se doda 250 µl 2% SDS-a i vorteksira 1 min. Nakon toga se doda 100 µl neutralnog fenol-kloroforma, vorteksira 30 sekundi i centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Supernatant, bez interfaze, se pomiješa s 1/10 volumena 3M natrijeva acetata (pH=4,8), i 1 volumenom izopropanola. Nakon inkubacije (5 minuta pri sobnoj temperaturi) slijedi centrifugiranje na 13 000 o/min tijekom 10 minuta. Talog se resuspendira u 300 µl 0,3 M NaAc i 10 mM MgCl₂ i vorteksira. Nakon dodatka 700 µl apsolutnog etanola (ohlađenog na -20°C), uzorak se inkubira preko noći pri -20°C. Nakon toga slijedi centrifugiranje pri 14000 o/min tijekom 20 minuta. Talog se suspendira u 75%-tnom etanolu (ohlađenom na -20°C) i ponovno centrifugira pri 13 000 o/min tijekom 5 minuta. Talog DNA se resuspendira u 50 µl TE (10mM Tris (pH 7,8) i 1mM EDTA) pufera.

3.2.3. PCR

Umnožavanje DNA molekule PCR metodom je provedeno u DNA-termobloku, Mastercycler personal, "Eppendorf". Kao DNA-kalup korištena je cjelokupna DNA bakterijskih stanica izolirana kao što je to opisano u poglavlju 3.2.2. Za sintezu željenog fragmenta DNA korištene su oligonukleotidne početnice konstruirane za fragmente *bsh* gena, koji kodira za hidrolazu žučnih soli, prikazane u tablici 3 (Jiang i sur., 2010).

Tablica 3. Sekvence korištenih oligonukleotidnih početnica (Jiang i sur., 2010)

Primer	Nukleotidna sekvenca (5'-3')	soj
bsh-Lp1f	TGTATTTTAGTAGGTATTTCAAGCATCTC	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp1r	CAATGAAATGGTTACGATTACGC	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp2f	GCTTTTTTGAGTTACTGCTTTTCTG	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp2r	GATGAGTTTCCCCAGCTTGTT	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp3f	ATCATTGAAAGTGCTATTCTGCC	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp3r	CGATGACGTTACGATTAAAACT	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp4f	ATGAGTTCCATCCGACCATAAAT	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-Lp4r	AGGTCTTGTTCCGGCTATTTGC	<i>Lactobacillus plantarum</i>
bsh-laAf	TACAACTATTCATTTAGACGCAATATCC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
bsh-laAr	CACTCTGCCAACACTCCATAACG	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
bsh-laBf	CAAAAGCCATTTATTCCGACTGA	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
bsh-laBr	CATAATTTATTACTTCCTTTGTTAGACAGC	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

Sastav reakcijske smjese volumena 25 µl je prikazana u tablici 4. Kao negativna kontrola je korištena PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa. PCR reakcija je provedena prema uvjetima navedenim u tablici 5.

Nakon reakcije, 15 µl reakcijske smjese, pomiješano s 2 µl boje je nanešeno na 1% agarozni gel i elektroforeza je provedena u kadici za elektroforezu pri naponu od 190 V.

Nakon provedene elektroforeze, gel je 30 minuta inkubiran u otopini etidijevog bromida, koncentracije 0,5 µg/mL, te zatim osvijetljen ultraljubičastim svjetlom u transiluminatoru i snimljen pri valnoj duljini od 254 nm upotrebom programa Gel Capture (Leboš Pavunc i sur., 2012).

Tablica 4. Sastav reakcijske smjese za provođenje PCR reakcije

Sastojci reakcijske smjese	Volumen
Pufer bez MgCl ₂	2,5 µL
MgCl ₂	2,5 µL
Kalup (DNA)	2,0 µL
dNTP	0,25 µL
Početnica Sprot 1	0,25 µL
Početnica Sprot 2	0,25 µL
dH ₂ O	17,125 µL
UKUPAN VOLUMEN:	25 µL

Tablica 5. Uvjeti PCR reakcije za amplifikaciju početnica

Uvjeti PCR reakcije	T [°C]	vrijeme
Početna denaturacija	95	3 min
25 ciklusa:		
Denaturacija	95	30 sek
Sparivanje početnica	57	30 sek
Produljivanje lanca DNA	72	30 sek
Završno produljivanje lanca DNA	72	5 min

Tablica 6. Oznake parova početnica korištenih za PCR

OZNAKA	PAROVI POČETNICA	
1	Lp1r	Lp1f
2	Lp2r	Lp2f
3	Lp3r	Lp3f
4	Lp4r	Lp4f
5	IaAf	IaAr

6	LaBr	LaBf
---	------	------

3.2.4. Kokultivacija soja *Lactobacillus plantarum* D13, nakon uzgoja sa i bez žučnih soli, uz test-mikroorganizme *Listera monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048

Proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus plantarum* D13 s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina prema metodi Kos i sur. (2008). Uz kokultivaciju provjeren je i utjecaj uzgoja sojeva producenata bakteriocina uz dodatak žučnih soli u koncentraciji 1 mg/ml na proizvodnju bakteriocina kao jednog od stresnih okolišnih čimbenika za bakterije mliječne kiseline. Nakon prekonoćnog uzgoja bakterijske stanice su isprane dva puta s fiziološkom otopinom. Inokulirano je 10^7 CFU/ml soja producenta bakteriocina dok su test-mikroorganizmi inokulirani u broju 10^3 i 10^4 CFU/ml. Združeni uzgoj je proveden u 50 ml BHI bujona na način da su test-mikroorganizmi dodani 2 sata nakon probiotičkog soja. Proveden je i uzgoj svih ispitivanih sojeva zasebno u BHI bujonu pri istim uvjetima. Inkubacija je provedena aerobno 48 h pri 37°C. Tijekom prvih 10 sati uzimani su uzorci svaka 2 sata, jer se stanice tada nalaze u eksponencijalnoj fazi rasta, te su također uzeti uzorci nakon 22, 24 i 48 h inkubacije, u stacionarnoj fazi rasta. Nakon uzimanja svakog uzorka izmjerena je pH vrijednost podloge. Broj živih stanica u uzorcima određivan je na MRS selektivnoj podlozi za laktobacile, Baird-Parker podlozi za test-mikroorganizam *St. aureus* 3048 i ChromoBio® *Listeria* podlozi za test-mikroorganizam *L. monocytogenes*. MRS ploče su inkubirane anaerobno, dok su Baird-Parker i ChromoBio® *Listeria* agar ploče inkubirane aerobno 48 sati pri 37°C te je nakon inkubacije određivan broj bakterijskih stanica izražen kao log CFU/ml.

3.2.5. Određivanje antibakterijske aktivnosti metodom difuzije s dvostrukim slojem agara ("Agar-spot-test metoda")

Tijekom kokultivacije također je provedeno ispitivanje bakteriocinske aktivnosti prema istim test – mikroorganizmima koji su korišteni za indukciju sinteze bakteriocina primjenom metode s dvostrukim slojem agara. Ispitivanje bakteriocinske aktivnosti je provedeno nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 h inkubacije, pri čemu su uzorci naciepljeni na MRS agar. Ploče su inkubirane anaerobno preko noći pri 37°C. Ploče naciepljene s uzorcima nakon kokultivacije

s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 su prelivene s 10 ml BHI soft agara (0,7%) koji je prethodno inokuliran s istim test-mikroorganizmom. Ploče nacijspljene s uzorcima nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111 su prelivene s 10 ml BHI soft agra (0,7%) koji je prethodno inokuliran s tim istim test-mikroorganizmom. Ploče su inkubirane aerobno preko noći pri 37°C. Nakon inkubacije izmjereni su promjeri porasle kulture (CD) i promjeri zone inhibicije (ID) te se izračunao efektivni inhibicijski odnos (EIR) prema sljedećem izrazu (Coeuret i sur., 2004):

$$\text{EIR} = (\text{ID} - \text{CD}) / \text{CD}$$

$\text{EIR} < 0,5$ – slaba inhibicija

$0,5 < \text{EIR} < 1,5$ – srednja inhibicija

$\text{EIR} > 1,5$ – jaka inhibicija

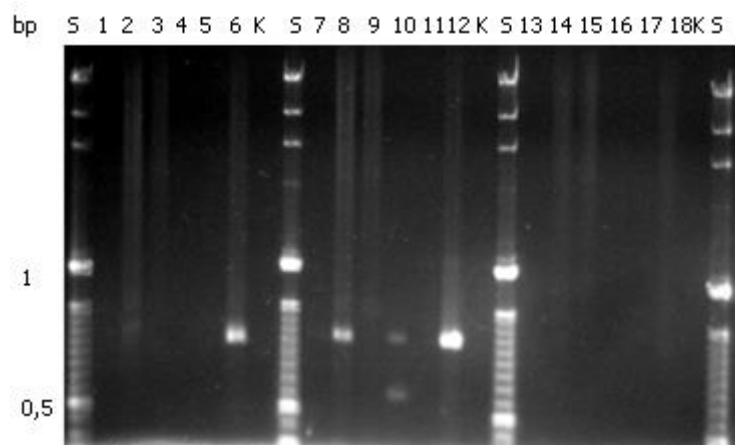
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Ispitivanje prisutnosti *bsh* gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli

Posljednjih tridesetak godina, bakterije mliječne kiseline se intenzivno istražuju u okviru probiotičkog koncepta. Pozitivni učinci probiotika su poboljšanje metabolizma laktoze, stimulacija imuno sustava, suzbijanje urogenitalnih i crijevnih infekcija, antitumorna aktivnost, suzbijanje alergijskih reakcija, modifikacija crijevne mikroflore i regulacija koncentracije kolesterola (Šušković i Kos, 2016).

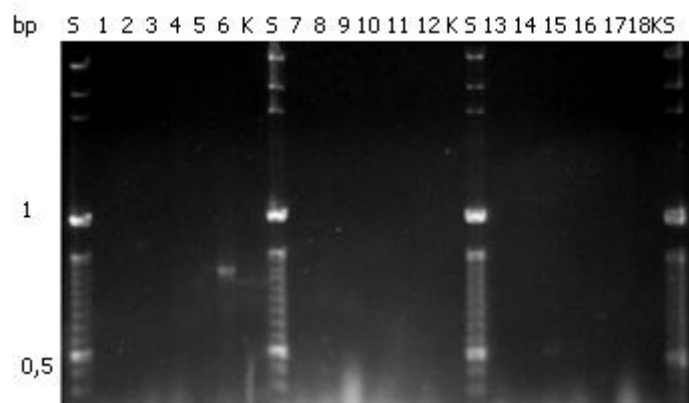
Mehanizam kojim bakterije mliječne kiseline utječu na smanjenje koncentracije kolesterola u podlozi nije još u potpunosti razjašnjen. Prema jednoj hipotezi probiotičke bakterije metaboliziraju neprobavljive ugljikohidrate i proizvode kratkolančane masne kiseline koje mogu utjecati na sintezu kolesterola u jetri i/ili prijenos kolesterola iz plazme u jetru. Probiotičke bakterije također mogu utjecati na apsorpciju kolesterola ili izravnom asimilacijom kolesterola ili dekonjugacijom žučnih soli, sprječavajući reapsorpciju kolesterola (Alhaj i sur., 2010). Da bi do toga došlo, bakterije moraju imati enzim hidrolazu žučnih soli. Osim toga, da bi došli do debelog crijeva, odakle trebaju polučiti pozitivan učinak na domaćina, bakterije moraju preživjeti nepovoljne uvjete u gastrointestinalnom traktu, koje između ostalog čine i žučne soli. Stoga su provedene PCR reakcije, s bakterijskim sojevima *L. helveticus* M92, *L. brevis* D6, *L. brevis* ZG1, *L. brevis* SF9B, *L. brevis* SF15B i *L. plantarum* D13, korištenjem različitih parova početnica, konstruiranim za fragmente *bsh* gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli, a koje su konstruirane prema sekvencama cjelovitih genoma standardnih sojeva *Lactobacillus plantarum* WCFS1 i *Lactobacillus acidophilus* NCFM. Korištene su različite početnice koje odgovaraju različitim fragmentima *bsh* gena navedenih standardnih sojeva. Ispitani sojevi bakterija mliječne kiseline su izolirani, identificirani te okarakterizirani kao probiotički u Laboratoriju za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura.

Na slici 3 su prikazani rezultati za prva tri para početnica (tablica 6), a na slici 4 za druga tri para početnica (tablica 6). Rezultati pokazuju da se korištenjem početnica broj 1 dobio signal kod sojeva *Lactobacillus plantarum* D13 i *Lactobacillus brevis* D6, a korištenjem početnica broj 2 se dobio signal kod sojeva *Lactobacillus plantarum* D13, *Lactobacillus brevis* D6 i *Lactobacillus brevis* SF9B (slika 3). Na slici 4 je vidljiv signal kod početnica broj 4 za soj *Lactobacillus plantarum* D13. Sve navedene početnice su dobivene iz genoma standardnog soja *Lactobacillus plantarum* WCFS1.



Slika 3.Produkti PCR reakcije korištenjem parova početnica (1-3, tablica 6) za potvrdu *bsh* gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli

1 - M92(par početnica broj 1); 2 - D6(par početnica broj 1); 3 - ZG1(par početnica broj 1); 4 - SF9B(par početnica broj 1); 5 - SF15B(par početnica broj 1); 6 - D13(par početnica broj 1); 7 - M92(par početnica broj 2); 8 - D6(par početnica broj 2); 9 - ZG1(par početnica broj 2); 10 - SF9B(par početnica broj 2); 11 - SF15B(par početnica broj 2); 12 - D13(par početnica broj 2); 13 - M92(par početnica broj 3); 14 - D6(par početnica broj 3); 15 - ZG1(par početnica broj 3); 16 - SF9B(par početnica broj 3); 17 - SF15B(par početnica broj 3); 18 - D13(par početnica broj 3); S – standard; K – negativna kontrola (PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa)



Slika 4.Produkti PCR reakcije korištenjem parova početnica (4-6, tablica 6) za potvrdu *bsh* gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli

1 - M92(par početnica broj 4); 2 - D6(par početnica broj 4); 3 - ZG1(par početnica broj 4); 4 - SF9B(par početnica broj 4); 5 - SF15B(par početnica broj 4); 6 - D13(par početnica broj 4); 7 - M92(par početnica broj 5); 8 - D6(par početnica broj 5); 9 - ZG1(par početnica broj 5); 10 - SF9B(par početnica broj 5); 11 - SF15B(par početnica broj 5); 12 - D13(par početnica broj 5); 13 - M92(par početnica broj 6); 14 - D6(par početnica broj 6); 15 - ZG1(par početnica broj 6); 16 - SF9B(par početnica broj 6); 17 - SF15B(par početnica broj 6); 18 - D13(par početnica broj 6); S – standard; K – negativna kontrola (PCR reakcijska smjesa bez DNA kalupa)

4.2.Kokultivacija *L. plantarum* D13 s test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111i *Staphylococcus aureus* 3048

Moderni potrošači su svjesni važnosti pravilne ishrane i iskazuju sve veći interes za prehrambenim proizvodima bez dodataka kemijskih aditiva. U proizvodnji fermentiranih proizvoda značajnu ulogu imaju bakterije mliječne kiseline koje doprinose aromi i teksturi, te poboljšanju kvalitete, a u slučaju primjene probiotika, doprinose i dodatnim funkcionalnim svojstvima fermentiranih namirnica. BMK imaju važnu ulogu u konzerviranju i osiguravanju mikrobiološke kvalitete fermentiranog proizvoda. To je posljedica proizvodnje različitih ekstracelularnih metabolita koji imaju antimikrobno djelovanje. U prvom redu to je posljedica proizvodnje mliječne, zatim octene kiseline, vodikovog peroksida, hlapivih komponenti poput diacetila, antifungalnih komponenti poput masnih kiselina, a i moguće biosinteze bakteriocina. Bakteriocini su ekstracelularni, ribosomski sintetizirani polipeptidi, čije je baktericidno djelovanje usmjereno prema sojevima istih ili srodnih vrsta.

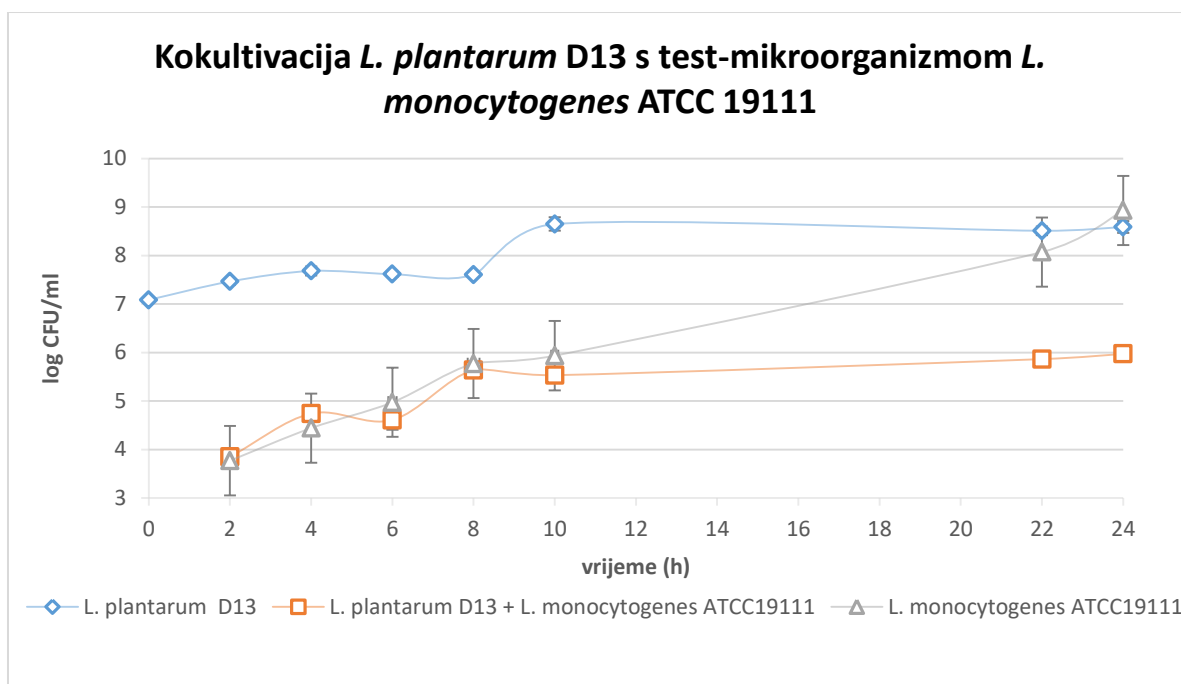
Na biosintezu bakteriocina utječe niz čimbenika, primjerice pH vrijednost medija, temperatura, faza rasta mikroorganizma producenta, no smatra se da je prisutnost mikroorganizma koji je osjetljiv na bakteriocinsko djelovanje presudan čimbenik. Stoga je u ovom radu ispitano antimikrobno djelovanje bakterijskog soja *Lactobacillus plantarum* D13, prema test-mikroorganizmima *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Staphylococcus aureus* 3048, nakon kokultivacije s istim test-mikroorganizmima. Izabran je soj *Lactobacillus plantarum* D13 jer je kod njega prethodno potvrđeno postojanje gena koji kodira za bakteriocin plantaricin (rezultat nije prikazan). Uz to, kako bi se dodatno osigurali stresni uvjeti koji bi trebali potaknuti proizvodnju bakteriocina, uzgoj soja *L. plantarum* D13 je proveden uz dodatak žučnih soli te je na isti način ispitano antimikrobno djelovanje.

Dakle, proveden je združeni uzgoj *Lactobacillus plantarum* D13, s test-mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 (bakterija srodna bakterijama mliječne kiseline) i *St. aureus* 3048, u svrhu provjere utjecaja kokultivacije na bakteriocinsku aktivnost soja producenta bakteriocina. Tijekom kokultivacije *L. plantarum* D13 s navedenim test – mikroorganizmima provjeravana je stimulacija bakteriocinske aktivnosti ispitivanjem inhibicijskog učinka soja producenta bakteriocina nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 h kokultivacije s test-mikroorganizmom metodom s dvostrukim sojem agara.

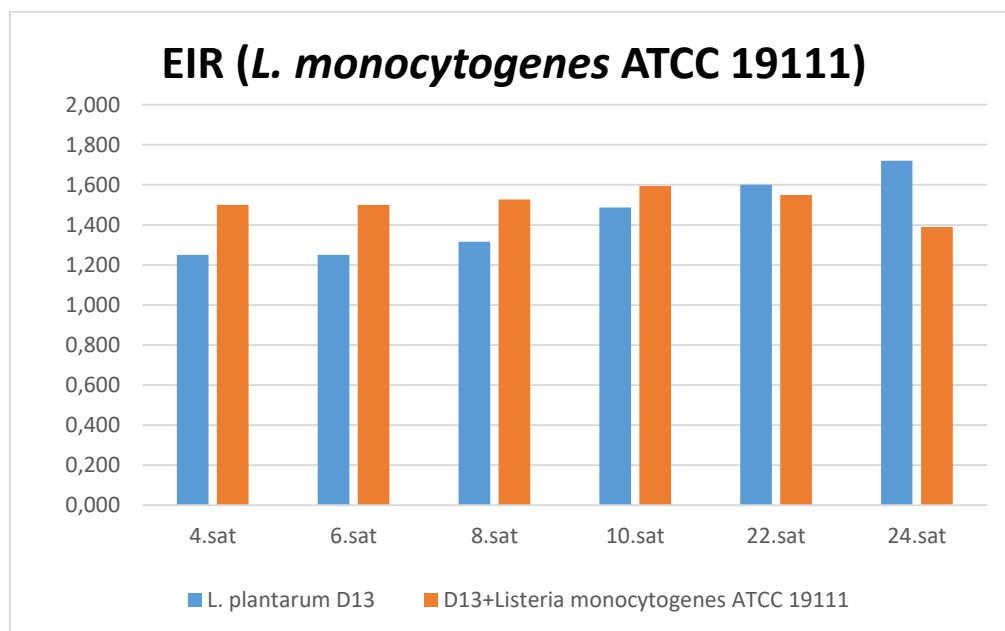
Iz dobivenih rezultata je vidljivo da rast test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 nije bio inhibiran prvih 10 sati kokultivacije s *Lactobacillus plantarum* D13, te je inhibicija rasta detektirana tek nakon 22 h kokultivacije (slika 5). Bakteriostatsko djelovanje bakteriocina se zadržalo i nakon 24h kokultivacije (slika 5) te čak i nakon 48h kokultivacije (rezultat nije prikazan), a broj živih stanica *L. monocytogenes* ATCC 19111 bio je za 3 log jedinice niži nego u kontroli (monokultura *L. monocytogenes* ATCC 19111). Međutim, provjerom bakteriocinskog djelovanja *L. plantarum* D13 nakon 4, 6, 8, 10, 22 i 24 h kokultivacije, vidljiva je stimulacija bakteriocinske aktivnosti prema *L. monocytogenes* ATCC 19111 prvih 10h kokultivacije, to jest tijekom eksponencijalne faze rasta soja producenta bakteriocina (slika 6). U stacionarnoj fazi rasta soja *L. plantarum* D13 u kokulturi i istog soja u monokulturi, inhibicijsko djelovanje prema *L. monocytogenes* ATCC 19111 se ne razlikuje. Navedeni mehanizmi djelovanja bakteriocina su u skladu s González i sur. (1994).

Sličan je učinak inhibicije rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 dobiven i tijekom kokultivacije s *L. plantarum* D13 uz dodatak žučnih soli (slika 7), kao i stimulacija bakteriocinske aktivnosti *L. plantarum* D13 koja je bila najveća nakon 8 h kokultivacije (slika 8). Dodatak žučnih soli kao stresnog okolišnog čimbenika za bakterije mliječne kiseline nije potaknuo dodatnu indukciju biosinteze bakteriocina s *L. plantarum* D13 tijekom kokultivacije.

Na kraju eksperimenta, u 48. satu, pH vrijednost je iznosila 5,95, dok je uz dodatak žučnih soli pH vrijednost bila 6,19 (rezultati nisu prikazani). Pri koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 48h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *L. monocytogenes* ATCC 19111 metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani). Kako *L. monocytogenes* ATCC 19111 nije osjetljiva na djelovanje mliječne kiseline koja je uzrokovala snižavanje pH vrijednosti hranjive podloge, inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* D13 ukazuje na njegovu bakteriocinsku aktivnost.

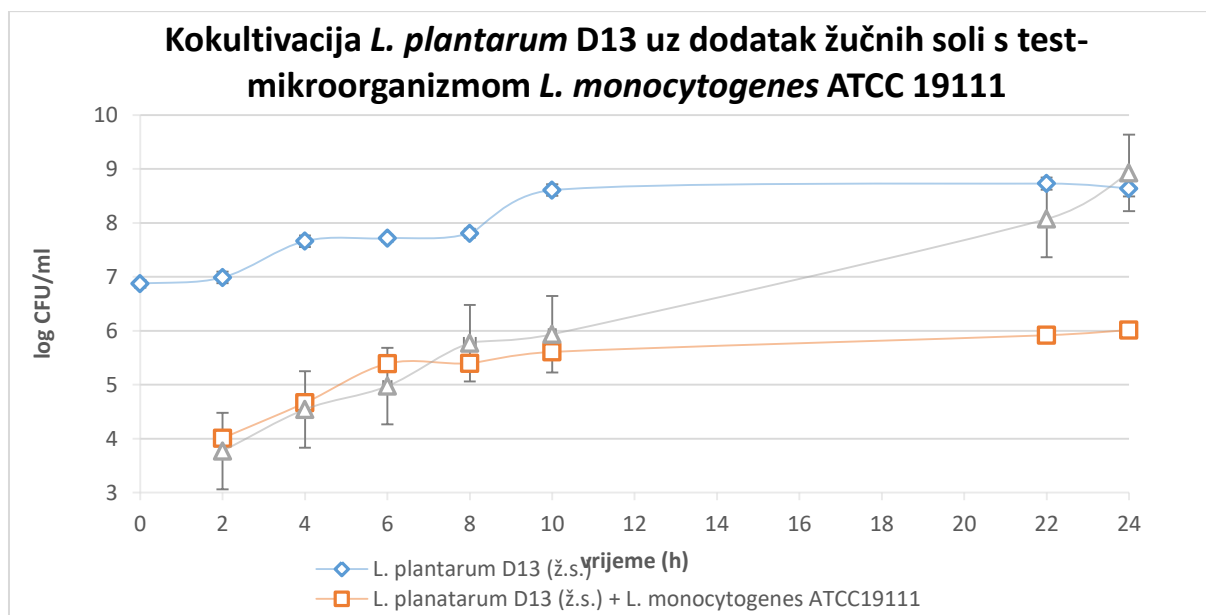


Slika 5. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *Lactobacillus plantarum* D13 (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta: *L. plantarum* D13 (plava linija) i *L. monocytogenes* ATCC 19111 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* D13 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111 odgovara rastu u monokulturi.

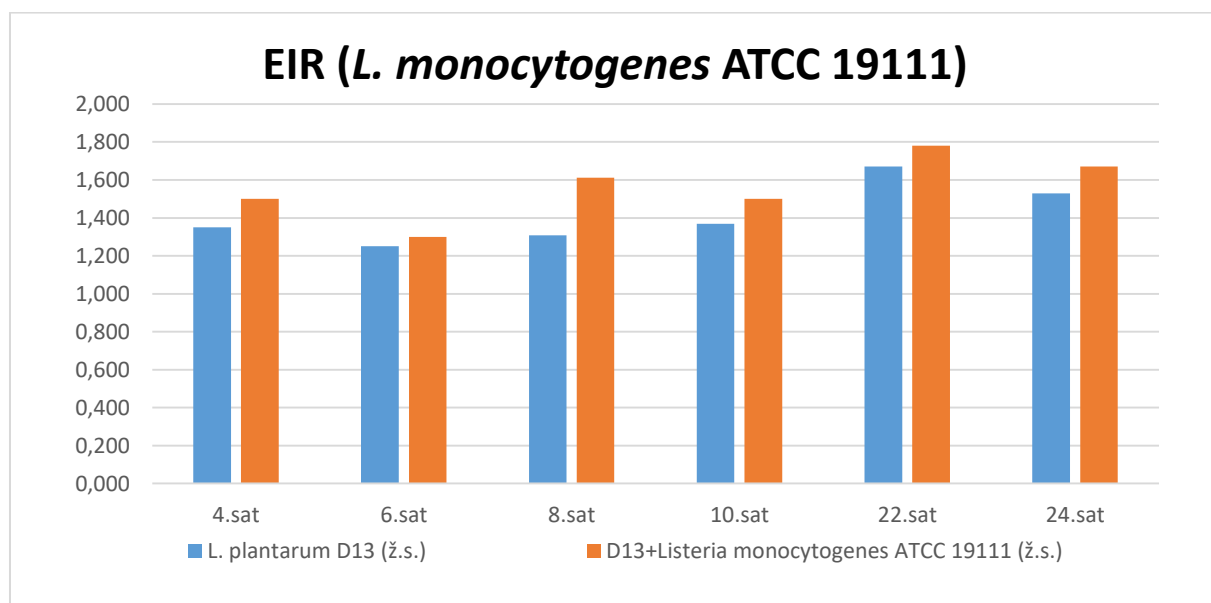


Slika 6. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus plantarum* D13 bez

prethodne kokultivacije (•) i nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC19111(▪)



Slika 7. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 tijekom kokultivacije sa producentom bakteriocina *Lactobacillus plantarum* D13 i uz dodatak 1 mg/ml žučnih soli (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta: *L. plantarum* D13 (plava linija) i *L. monocytogenes* ATCC 19111 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* D13 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111 odgovara rastu u monokulturi.



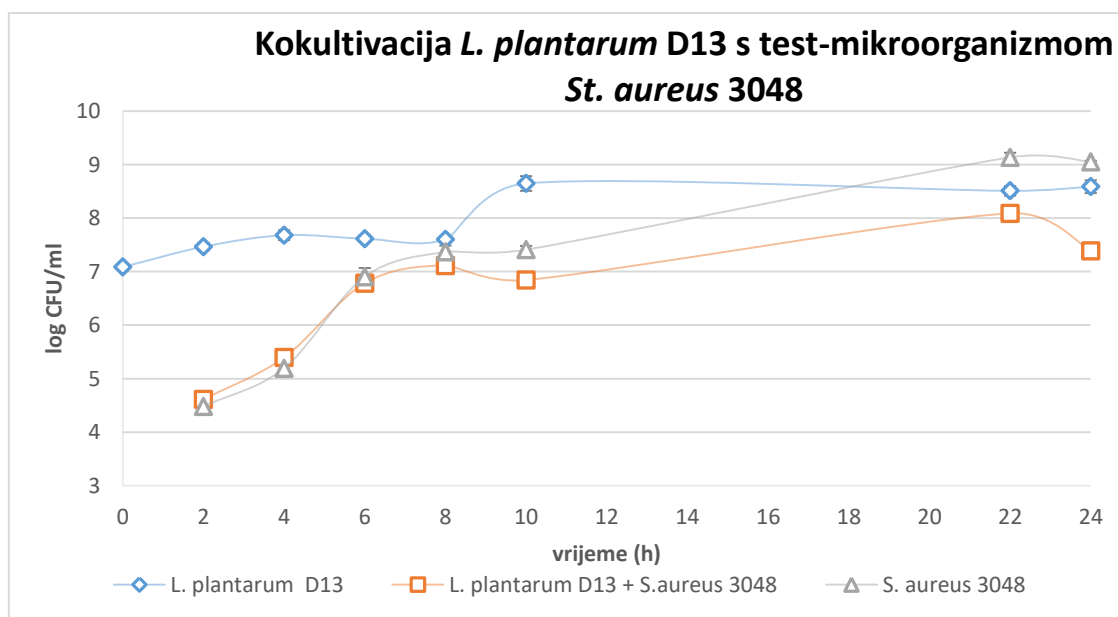
Slika 8. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *L. monocytogenes* ATCC 19111 s *Lactobacillus plantarum* D13 uzgojenog u

prisutnosti žučnih soli bez prethodne kokultivacije(▪) i nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *L. monocytogenes* ATCC 19111(▪)

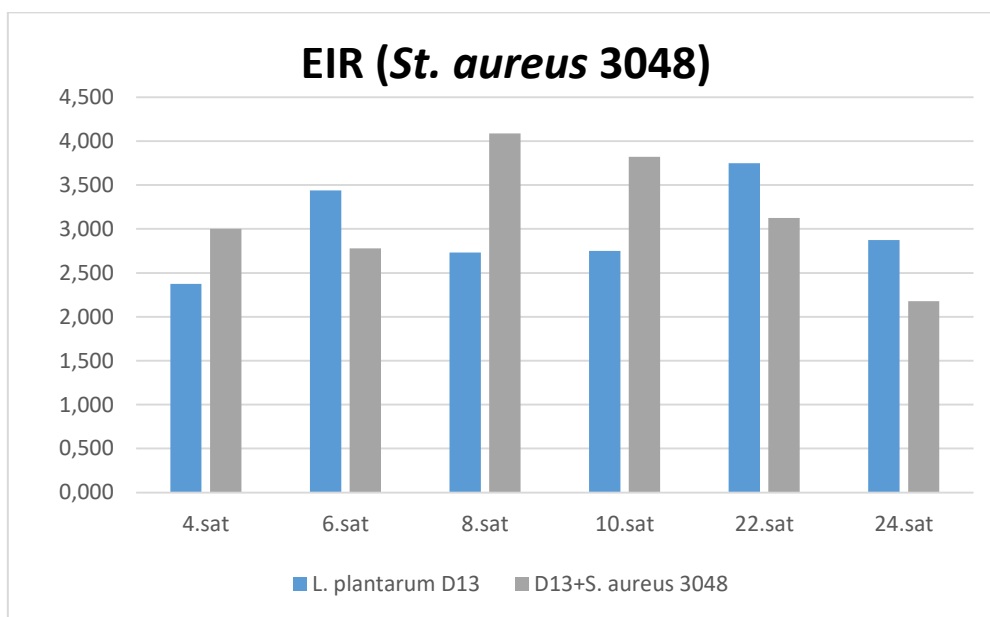
U slučaju kokultivacije *L. plantarum* D13 s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 došlo je do nešto slabije inhibicije rasta test-mikroorganizma *St. aureus* 3048, također tek u stacionarnoj fazi rasta, a inhibicija je iznosila oko 1 log jedinicu u odnosu na rast *St. aureus* 3048 u kontroli (slika 9). Ponovno je došlo do stimulacije bakteriocinske aktivnosti *L. plantarum* D13 tijekom eksponencijalne faze rasta u kokulturi u odnosu na bakteriocinsku aktivnost soja *L. plantarum* D13 uzgojenog u monokulturi, dok u stacionarnoj fazi rasta nema stimulacije bakteriocinske aktivnosti (slika 10).

Ako se usporedi učinak postignut kad su u hranjivu podlogu bile dodane žučne soli, došlo je do blagog povećanja inhibicijskog učinka na rast test-mikroorganizma *St. aureus* 3048 (slika 11), te je ustanovljen dodatni stimulacijski učinak žučnih soli na bakteriocinsku aktivnost soja *L. plantarum* D13 (slika 12), jer je nakon 22 h kokultivacije inhibicija za oko 1,5 log jedinicu veća u prisutnosti 1 mg/ml žučnih soli.

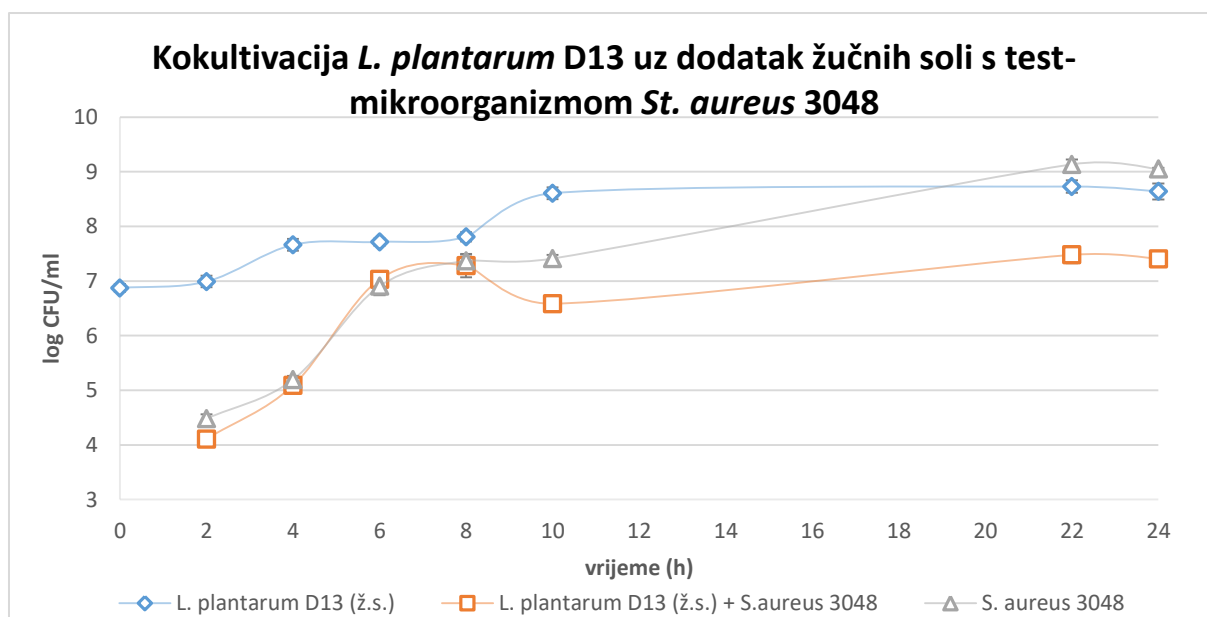
Nakon 48 h kokultivacije pH vrijednost je iznosila 6,5. Pri koncentracijama mliječne kiseline u uzorcima nakon 48h kokultivacije nije ustanovljena inhibicija rasta *St. aureus* 3048, ispitana metodom difuzije s rupama u agaru (rezultati nisu prikazani). Kako *St. aureus* 3048 nije osjetljiv na djelovanje mliječne kiseline koja je uzrokovala snižavanje pH vrijednosti hranjive podloge, inhibicijsko djelovanje *L. plantarum* D13 ukazuje na njegovu bakteriocinsku aktivnost.



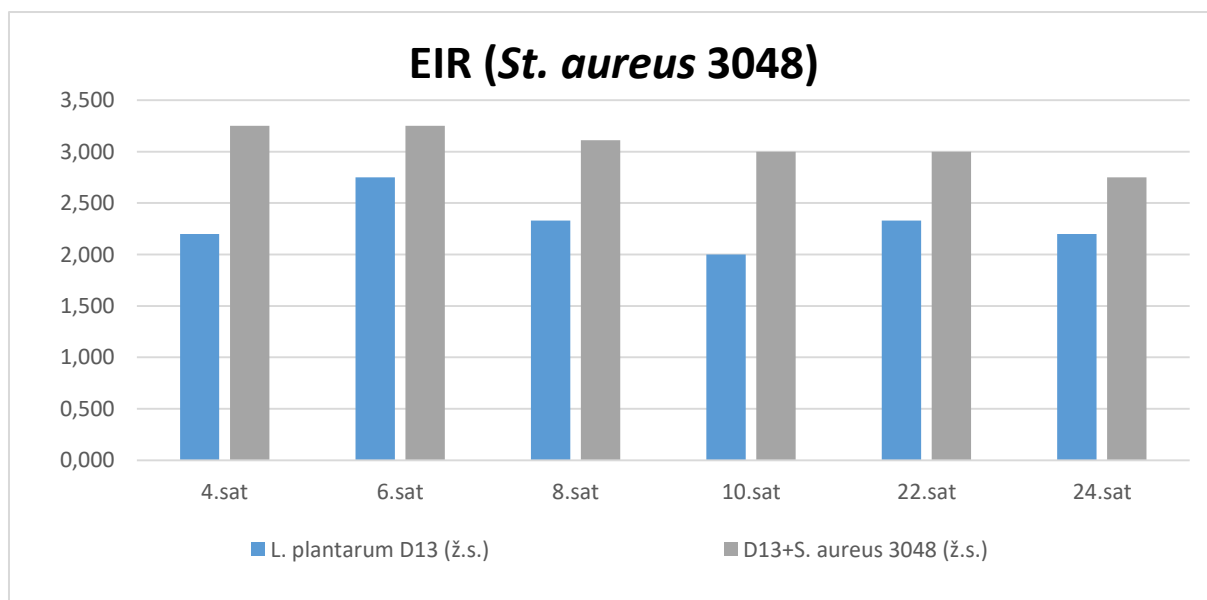
Slika 9. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *St. aureus* 3048 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *Lactobacillus plantarum* D13 (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta: *L. plantarum* D13 (plava linija) i *St. aureus* 3048 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* D13 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 odgovara rastu u monokulturi.



Slika 10. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *St. aureus* 3048 s *Lactobacillus plantarum* D13 bez prethodne kokultivacije (▪) i nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 (■)



Slika 11. Inhibicija rasta test-mikroorganizma *St. aureus* 3048 tijekom kokultivacije s producentom bakteriocina *Lactobacillus plantarum* D13 i uz dodatak 1 mg/ml žučnih soli (narančasta linija). Prikazane su i krivulje rasta: *L. plantarum* D13 (plava linija) i *St. aureus* 3048 (siva linija) u monokulturi. Rast *L. plantarum* D13 u kokultivaciji s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 odgovara rastu u monokulturi.



Slika 12. Usporedba efektivnog inhibicijskog odnosa (EIR) tj. inhibicije rasta test-mikroorganizma *St. aureus* 3048 s *Lactobacillus plantarum* D13 uzgojenog u prisutnosti žučnih soli bez prethodne kokultivacije (■) i nakon kokultivacije s test-mikroorganizmom *St. aureus* 3048 (■).

5. ZAKLJUČAK

1. PCR reakcijom je potvrđeno postojanje fragmenata *bsh* gena koji kodira za hidrolazu žučnih soli kod sojeva *Lactobacillus plantarum* D13, *L. brevis* D6 i *L. brevis* SF9B.
2. Bakteriocinska aktivnost probiotičkog soja *Lactobacillus plantarum* D13 je inducirana kokultivacijom s test – mikroorganizmima *L. monocytogenes* ATCC 19111 i *St. aureus* 3048.
3. Dodatkom žučnih soli, kao stresnih okolišnih čimbenika za bakterije mliječne kiseline, dodatno je potaknuto bakteriocinsko djelovanje soja *L. plantarum* D13 prema test–mikroorganizmu *St. aureus* 3048.

6. LITERATURA

Ajouz H., Mukherji D., Shamseddine A. (2014) Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer. *World Journal of Surgical Oncology***12**: 164.

Alhaj O. A., Kanekanian A. D., Peters A. C., Tatham A.S. (2010) Hypocholesterolaemic effect of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Bb12) and trypsin casein hydrolysate. *Food Chemistry***123**: 430-435.

Ammor S., Tauveron G., Dufour E., Chevallier I. (2006) Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small - scale facility 1- Screening and caharacterization of the antimicrobial compounds. *Food Control***17**: 454 – 461.

Angelakis E., Merhej V., Raoult D. (2013) Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification. *Lancet Infect Diseases***13**: 889 – 899.

Begley M., Gahan C. G., Hill C. (2005) The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Review***29**: 625 – 651.

Begley M., Hill C., Gahan C. G. (2006) Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Applied Environmental Microbiology***72**: 1729 – 1738.

Brkić B. (1995) Fiziološke značajke i antibakterijska aktivnost odabranih bakterija mliječne kiseline. *Magistarski rad*, Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Carr F. J., Hill D., Maida N. (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews Microbiology***28**: 281 – 370.

Choi S. B., Lew L. C., Yeo S. K., Nair Parvathy S., Liong M. T. (2015) Probiotics and the BSH-related cholesterol lowering mechanism: a Jekyll and Hyde scenario. *Critical Reviews in Biotechnology***35**: 392 – 401.

Coeuret V., Gueguen M., Vernoux J. P. (2004) In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. *Journal of Dairy Research***71**: 451-460.

Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews. Microbiology***3**: 777-788.

de Aguiar Vallim T. Q., Tarling E. J., Edwards P. A. (2013) Pleiotropic roles of bile acids in metabolism. *Cell Metabolism***17**: 657 – 669.

De Vuyst, L., Leroy, F. (2007) Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology***13**:194-199.

González, B., Arca, P., Mayo, B., Suárez, J.E. (1994) Detection, Purification, and Partial Characterization of Plantaricin C, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2158-2163.

Hammes W. P., Vogel R. F. (1995) The genus *Lactobacillus*. U: The genera of lactic acid bacteria, Wood B. J. B i Holzapfel W. H., ur., Springer Science & Business Media. str. 19 – 54.

Islam K. B., Fukiya S., Hagio M., Fujii N., Ishizuka S., Ooka T. (2011) Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology***141**: 1773 – 1781.

Jiang J., Hang X., Zhang M., Liu X., Li D., Yang H. (2010) Diversity of bile salt hydrolase activities in different lactobacilli toward human bile salts. *Annals of Microbiology***66**: 81-88.

Jones M. L., Martoni C. J., Prakash S. (2012) Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition***66**: 1234 – 1241.

Jones M. L., Tomaro – Duchesneau C., Martoni C. J., Prakash S. (2013) Cholesterol lowering with bile salt hydrolase – active probiotic bacteria, mechanism of action, clinical evidence, and future direction for heart health applications. *Expert Opinion on Biological Therapy***13**: 631 – 642.

Joyce S. A., Shanahan F., Hill C., Gahan C. G. (2014) Bacterial bile salt hydrolase in host metabolism: Potential for influencing gastrointestinal microbe-host crosstalk. *Gut Microbes***5**: 669 – 674.

Kleerebezem M., Hols P., Hugenholtz J. (2000) Lactic acid bacteria as a cell factory: rerouting of carbon metabolism in *Lactococcus lactis* by metabolic engineering. *Enzyme and Microbial Technology***26**: 840 – 848.

Kos B., Šušković J., Beganović J., Gjuračić K., Frece J., Iannaccone C., Canganella F. (2008) Characterization of the three selected probiotic strains for the application in food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology***24**: 699-707.

Leboš Pavunc A., Beganović J., Kos B., Uroić K., Blažić M., Šušković J. (2012) Characterization and application of autochthonous starter cultures for fresh cheese production. *Food Technology and Biotechnology* **50**: 141-151.

Lin J. (2014) Antibiotic growth promoters enhance animal production by targeting intestinal bile salt hydrolase and its producers. *Frontiers of Microbiology***5**: 33.

Liu S. Q. (2003) Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology***83**: 115 – 13.

Maran R. R., Thomas A., Roth M., Sheng Z., Esterly N., Pinson D. (2009) Farnesoid X receptor deficiency in mice leads to increased intestinal epithelial cell proliferation and tumor development. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***328**: 469 – 477.

Mobolaji O. A., Wuraola F. O. (2011) Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from two fermented maize products – ogi and kunni – zaki. *Malaysian Journal of Microbiology***7**: 124 – 128.

Nes I. F., Kjos M., Diep D. B. (2012) Antimicrobial Components of lactic acid bacteria; Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. *CRC Press* 285 – 311.

Papagianni M. (2012) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of industrially important compounds. *Computational and structural biotechnology journal***3**: 1 – 8.

Rattanachaikunsopon P., Phumkhachorn P. (2010) Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research***1**: 218 – 228.

Smith K., Zeng X., Lin J. (2014) Discovery of bile salt hydrolase inhibitors using an efficient high – throughput screening system. *PLoS One***9**: e85344.

Sunil K. i Narayana B. (2008) Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide in water and cream samples. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***81**: 422 – 426.

Swann J. R., Want E.J., Geier F. M., Spagou K., Wilson I. D., Sidaway J. E. (2011) Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA***108**: 4523 – 4530.

Šušković J. (1996) Rast i probiotičko djelovanje odabranih bakterija mliječne kiseline. *Disertacija*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Šušković J., Kos B., Matošić S. (1998). Probiotici: znanstvena činjenica ili pomodni trend?. *Mljekarstvo***48**: 165 – 176.

Šušković J., Kos, B. (akad. god. 2016./2017.) Predavanja iz predmenta „Biotehnologija 4“. <http://moodle.srce.hr/2016-2017/course/view.php?id=12905> Pristupljeno 19. travnja 2017.

Šušković J., Kos B., Beganović J., Leboš Pavunc A., Habjanič K., Matošić S. (2010) Antimicrobial Activity – The most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology and Biotechnology***48**: 296-307.

Vaishnava S., Yamamoto M., Severson K. M., Ruhn K. A., Yu X., Koren O. (2011) The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine. *Science***334**: 255 – 258.

Watanabe M., Houten S. M., Matakai C., Christoffolete M. A., Kim B. W., Sato H. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature***439**: 484 – 489.

Zalan Z., Nemeth E., Barath A., Halasz A. (2005) Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. *Food Technology and Biotechnology***43**: 219 – 225.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

ime i prezime studenta